

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

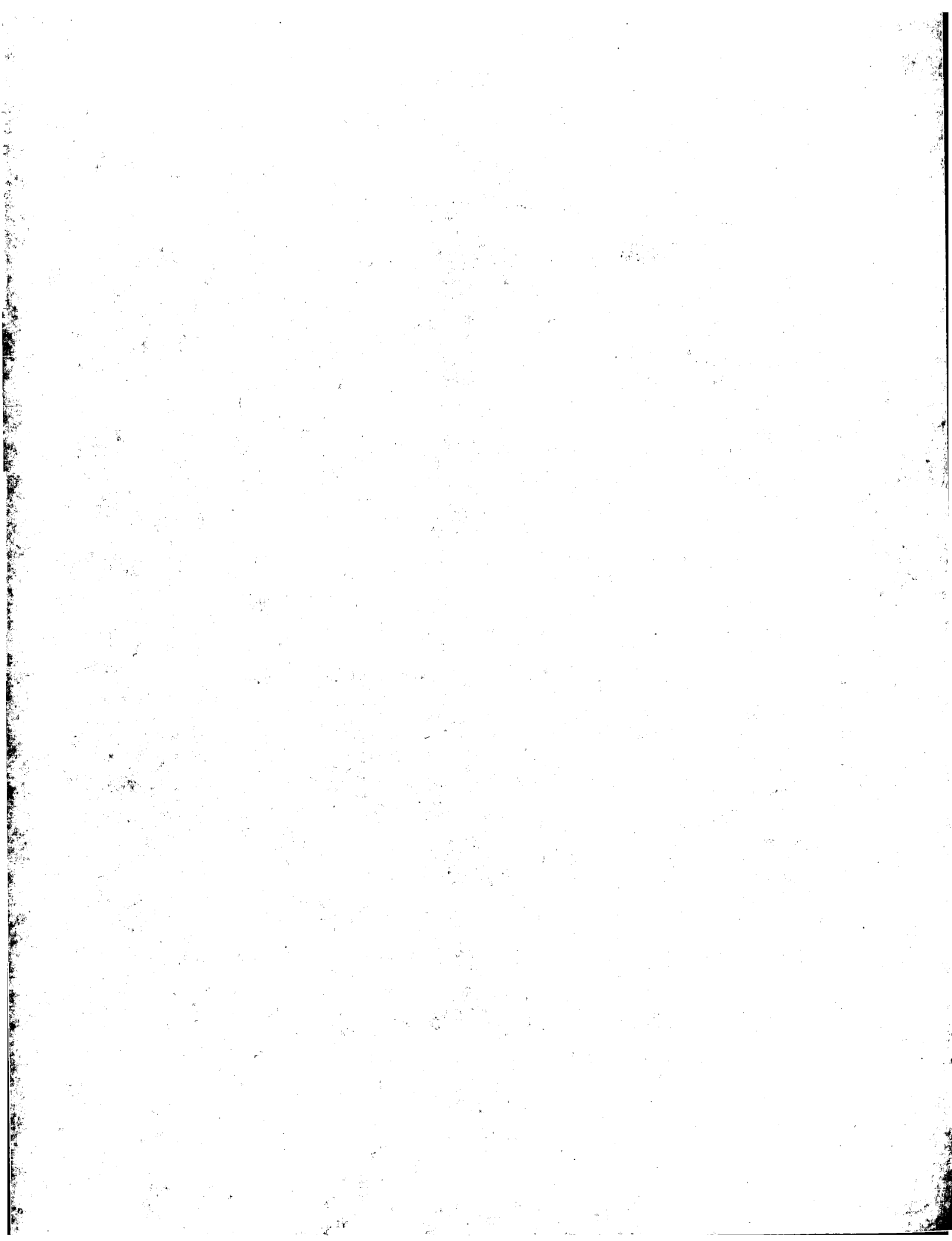
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



51

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

Int. Cl.:

C 07 d, 55/56

C 07 d, 91/44

DEUTSCHES PATENTAMT



52

Deutsche Kl.:

12 p, 10/05

12 p, 4/01

10

11

21

22

43

Offenlegungsschrift 2147 466

Aktenzeichen: P 21 47 466.8

Anmeldetag: 23. September 1971

Offenlegungstag: 29. März 1973

Ausstellungspriorität: —

30

Unionspriorität

32

Datum: —

33

Land: —

31

Aktenzeichen: —

54

Bezeichnung: Tetrazoliumsalze

61

Zusatz zu: —

62

Ausscheidung aus: —

71

Anmelder: Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim

Vertreter gem. § 16 PatG: —

72

Als Erfinder benannt: Rittersdorf, Walter, Dr. rer. nat.; Rey, Hans-Georg, Dr. rer. nat.;
Rieckmann, Peter, Dr. rer. nat.; 6800 Mannheim-Waldhof;
Wahlefeld, August Wilhelm, Dr. rer. nat., 8120 Weilheim;
Nelböck-Hochstetter, Michael, Dr. phil., 8132 Tutzing

DT 2147466

2147466

Tetrazoliumsalze

Tetrazoliumsalze sind wertvolle Reagenzien zur Sichtbarmachung biologischer Reduktionsvorgänge. Sie stellen im allgemeinen farblose Verbindungen dar, die durch Reduktion, z.B. mit einem reduzierenden Zucker, in starkfarbige, wenig lösliche Körper übergehen, die man als Formazane bezeichnet (L. F. Fieser + M. Fieser, Org. Chemie, Verl. Chemie, 1965 S. 1437). Es ist seit langem bekannt, daß reduzierte Pyridinnucleotide unter der Katalyse von N-Methylphenazinium-salzen (PMS) oder dem Enzym Diaphorase mit Tetrazoliumsalzen in der oben beschriebenen Weise reagieren. Auf dieser Reaktion beruhen eine Reihe von Bestimmungsmethoden für reduzierte Pyridinnucleotide und damit von Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Enzymen; so läßt sich beispielsweise die Aktivität von Lactat-Dehydrogenase (LDH) dadurch bestimmen, daß Lactat unter Katalyse von Lactat-Dehydrogenase mit Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) zu Pyruvat und reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) umgesetzt wird. Das gebildete NADH reagiert nun beispielsweise in Gegenwart des Enzyms Diaphorase mit Tetrazoliumsalzen unter Bildung von NAD und farbigen Formazanen, deren Konzentration photometrisch bestimmt werden kann.

Für den Nachweis von NADH stehen bis jetzt nur wenige Tetrazoliumsalze zur Verfügung [z.B. Triphenyl-tetrazoliumchlorid, (TTC), Jodphenyl-nitrophenyl-tetrazoliumsalze (INT), 2,5-Diphenyl-3[4,5-dimethyl-thiazolyl-(2)]-tetrazoliumbromid (MTT), die sich jedoch für quantitative Bestimmungen im Photometer nicht gut eignen, da sie folgende hierfür notwendige Bedingungen nicht hinreichend erfüllen:

309813/1188

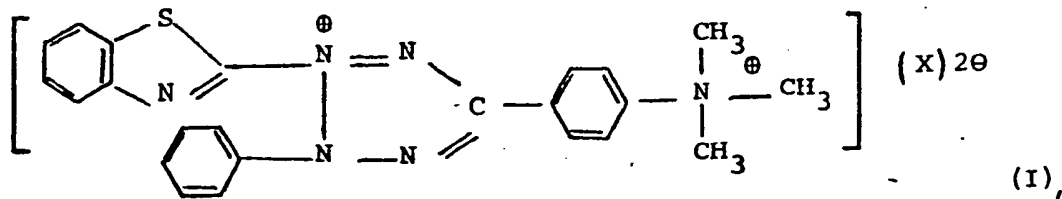
./.

2147466

- 1.) Sowohl das Tetrazoliumsalz als auch das bei der Reduktion gebildete Formazan muß in wässriger Lösung auch ohne Zusatz von organischen Lösungsmitteln oder Lösungsmittlern leicht löslich sein.
- 2.) Das Tetrazoliumsalz muß unter den Reaktionsbedingungen der enzymatischen Bestimmung leicht und schnell reduziert werden.
- 3.) Das gebildete Formazan muß ein Absorptionsmaximum in einem günstigen Meßbereich, möglichst um 550 nm besitzen.
- 4.) Der molare Extinktionskoeffizient und damit die Empfindlichkeit muß sehr hoch sein.

Zweck der vorliegenden Erfindung war es, Tetrazoliumsalze zu entwickeln, welche sich für eine enzymatische NADH-Bestimmung im Photometer eignen und die obigen Bedingungen in möglichst idealer Weise erfüllen.

Es wurde gefunden, daß die bisher nicht bekannten 2-Benzthiazolyl-(2)-3-phenyl-5-(4-N-trimethylammonium-phenyl)-tetrazoliumsalze der Formel I



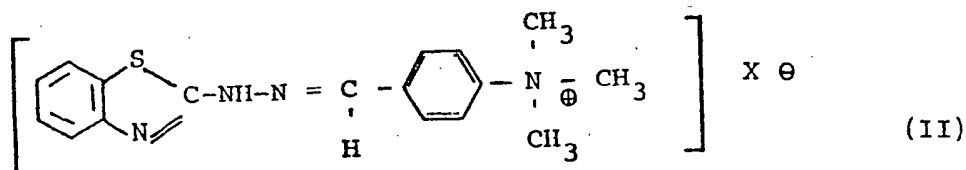
309813/1188

-3-

in welcher X ein oder mehrere Anionen organischer oder anorganischer Säuren bedeutet, leicht löslich sind, schnell und empfindlich reagieren und überraschenderweise Formazane ergeben, die ein günstiges Absorptionsmaximum bei 525 nm besitzen und sich außerdem durch außergewöhnliche Löslichkeit und einen hohen molaren Extinktionskoeffizienten auszeichnen. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind somit zum fotometrischen Nachweis von NADH und anderen reduzierenden Stoffen hervorragend geeignet.

Als Anionen kommen zum Beispiel Chlorid, Bromid, Jodid, Nitrat, Fluoroborat, Perchlorat, Sulfat, Oxalat und Tartrat infrage. Da jedoch die Wahl des Anions für die Reaktionsfähigkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen nicht von wesentlicher Bedeutung ist, lassen sich auch andere Anionen und Anionen-Kombinationen mit dem Tetrazoliumkation zu reaktionsfähigen Salzen vereinigen. Es versteht sich von selbst, daß Anionen, welche die erstrebten Eigenschaften des Nachweisreagens, beispielsweise die Leichtlöslichkeit wieder aufheben oder den Nachweis z.B. durch Inhibitorwirkung (Fluoride) stören, nicht geeignet sind.

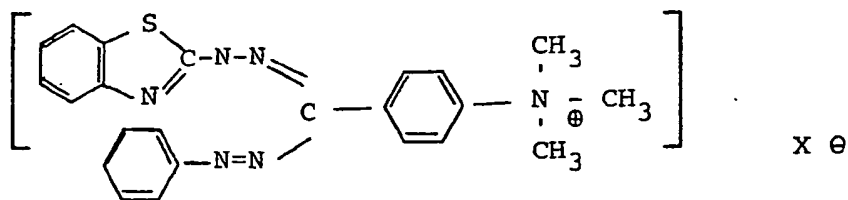
Die Herstellung der erfindungsgemäßen Substanzen erfolgt in an sich bekannter Weise durch Umsetzung eines Hydrazons der Formel II



309813//1188

2147466

in welcher X Θ die obengenannte Bedeutung hat,
mit einem reaktiven Benzoldiazoniumsalz, vorzugsweise mit
Benzoldiazoniumchlorid, und anschließende Oxidation des
erhaltenen Formazans der Formel III



(III),

in welcher X Θ die obengenannte Bedeutung hat,
zu Verbindungen der Formel I mit einem geeigneten Oxidationsmittel,
wobei das Anion bzw. die Anionen erfindungsgemäß durch Umsetzung
mit entsprechenden Alkalisalzen oder entsprechend beladenen
Anionenaustauschern modifiziert werden können.

Für die Umsetzung mit den Verbindungen III kommen als Hydrazon-
salze II insbesondere die Halogenide, vorzugsweise Chloride
infrage.

Als Oxidationsmittel für die Verbindungen III kommen Quecksilber-
(II)-oxid, Isoamylnitrit, Bleitetraazetat, N-Bromsuccinimid oder
N-Chlorphthalimid infrage.

Die als Ausgangsprodukte verwendeten Verbindungen der Formel II,
werden in bekannter Weise z.B. durch Umsetzung von p-N-
Trimethylammonium-benzaldehyd-chlorid mit 2-Hydrazinobenzthiazol
in Eisessig und gegebenenfalls anschließende Modifikation des
Restes X hergestellt.

Die erfindungsgemäßen Tetrazoliumsalze eignen sich ganz allgemein
für die Bestimmung reduzierender Substanzen z.B. von reduzierenden
Zuckern, Ascorbinsäure oder Ketosteroiden. Hierbei müssen lediglich
die Reaktionsbedingungen der gesteigerten Reaktivität angepaßt
werden. Hauptaufgabe der vorliegenden Erfindung war jedoch, ein
Reagenz zum Nachweis biologischer Reduktionsvorgänge bereit-
zustellen, das insbesondere zur Bestimmung von Enzymen oder
deren Substraten dient, bei deren Reaktionen reduzierte Pyridin-
nucleotide gebildet oder verbraucht werden.

309813/1188

./.

Als reduzierte Pyridinnucleotide kommen vor allem Nicotin-adenin-dinucleotid (NADH), Nicotin-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH) und Acetylpyridin-dinucleotid (APADH) infrage. Erfindungsgemäß können beispielsweise die Enzyme Lactat-Dehydrogenase (LDH), Malat-Dehydrogenase (MDH) und Glutamat-Dehydrogenase (Gl.DH) bestimmt werden.

Es lassen sich enzymatisch auch beispielsweise folgende Substrate bestimmen: Äthanol mit Alkohol-Dehydrogenase, Glucose mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Galaktose mit Galaktose-Dehydrogenase sowie Glycerin mit Glycerokinase und Glycerophosphat-Dehydrogenase.

Als Reduktionskatalysatoren eignen sich Diaphorase und N-Methylphenazinium-methosulfat (PMS), wobei prinzipiell hinsichtlich der Versuchs- und Reaktionsbedingungen kein Unterschied zu den bekannten Tetrazoliumsalzen besteht.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur näheren Erläuterung der Erfindung.

309813/1188

./.

Beispiel 1Herstellung von 2-Benzthiazolyl-(2)-3-phenyl-5-(4-N-trimethylammoniumphenyl)-tetrazolium-dichlorida) p-Trimethylammonium-benzaldehyd-chlorid

29,8 g (0,2 Mol) p-Dimethylaminobenzaldehyd werden mit 56 g (0,4 Mol) Methyljodid in 100 ml Acetonitril 8 Stunden unter Rühren am Rückfluß gekocht. Nach weiterem zweistündigem Rühren bei Zimmertemperatur werden die gebildeten farblosen Kristalle von p-Trimethylammonium-benzaldehyd-iodid abgesaugt und mit wenig eiskaltem Acetonitril gewaschen.

Fp. 158° Ausbeute: 48,6 g (80,7 d.Th.)

30 g p-Trimethylammonium-benzaldehyd-iodid werden in 100 ml Wasser gelöst und über einen mit Chloridionen beladenen Anionenaustauscher (Amberlite IRA 400) gegeben. Aus dem Eluat erhält man beim Einengen farblose etwas hygroskopische Kristalle von p-Trimethylammonium-benzaldehyd-chlorid Fp. 203 - 204°. Ausbeute: 19,8 g (= 96,3 % d.Th.)

b) p-N-Trimethylammonium-benzaldehyd-benzthiazolyl-(2)-hydrazon-chlorid

25 g (0,125 Mol) p-N-Trimethylammonium-benzaldehyd-chlorid werden mit 20,8 g (0,125 Mol) 2-Hydrazinobenzthiazol in 300 ml Eisessig 6 Stunden bei 80 - 90° C gerührt. Nach Einengen im Vakuum und Zugabe von wenig Alkohol kristallisiert die Substanz in leicht gelblichen Kristallen, die aus Methanol umkristallisiert werden. Man erhält 39,4 g (= 90,5 % d.Th.) p-N-Trimethylammonium-benzaldehyd-benzthiazolyl-(2)-hydrazon-chlorid Fp. 215° C.

309813/1188

./.

- 7 -

c) 1-Phenyl-3-(4-N-trimethylammoniumphenyl)-chlorid-5-benzthiazolyl-(2)-formazan

20,7 g (0,06 Mol) p-N-Trimethylammonium-benzaldehyd-benzthiazol-(2)-hydrazon-chlorid werden in 600 ml Wasser und 150 ml Pyridin gelöst und auf 0° C abgekühlt. Danach wird aus 6,5 g Salzsäure, 6 ml Wasser und 2,8 ml Anilin bei 0° C unter Zugabe von 2,1 g Natriumnitrit in 5 ml Wasser eine Benzol-diazoniumsalzlösung hergestellt. Diese wird bei 0° C unter Rühren und weiterem Kühlen innerhalb einer halben Stunde in die vorgelegte Hydrazonlösung eingetropft, dabei fällt das Formazan in grünen Kristallen an. Nach 1 Stunde Weiterrühren wird der voluminöse Niederschlag abgesaugt und mit ca. 150 ml Wasser in kleinen Portionen gewaschen. Nach dem Abfiltrieren wird der trockene Rückstand mit 200 ml trockenem Dioxan angerührt und abgesaugt. Man erhält 24 g (89,4 % d.Th.) 1-Phenyl-3-(4-N-trimethylammoniumphenyl)-chlorid-5-benzthiazolyl-(2)-formazan. Fp. 152° C (Zers.).

d) 2-Benzthiazolyl-(2)-3-phenyl-5-(4-N-trimethylammonium-phenyl)-tetrazolium-dichlorid

18 g (0,04 Mol) 1-Phenyl-3-(4-N-trimethylammoniumphenyl)-chlorid-5-benzthiazolyl-(2)-formazan werden in 450 ml Methanol gelöst. Die dunkelrote Lösung wird mit 13,5 g N-Chlorphtalimid versetzt, langsam erwärmt und solange unter Rückfluß gekocht, bis eine hellgelbe Lösung entstanden ist. Nach Abkühlen auf 5 - 10° C wird das überschüssige N-Chlorphtalimid (ca. 6 g) abgesaugt und mit wenig kaltem Methanol gewaschen. Das Filtrat wird dann mit 2,5 Liter Äther versetzt. Das abgeschiedene voluminöse Tetrazoliumsalz wird abgesaugt und mit ca. 250 ml Essigester angerührt. Die so erhaltenen gelben Kristalle werden zur weiteren Reinigung aus 160 ml n-Propanol umkristallisiert, wobei durch Zugabe von etwas Aktivkohle die dunkelbraune Lösung geklärt wird. Man erhält 15 g (71,3 % d.Th.) 2-Benzthiazolyl-(2)-3-phenyl-5-(4-N-trimethyl-ammoniumphenyl)-tetrazolium-dichlorid. Fp. 156° C (Zers.)

309813/1188

./.

2147466

Beispiel 2

Darstellung weiterer 2-Benzthiazolyl-(2)-3-phenyl-5-(4-N-trimethylammoniumphenyl)-tetrazoliumsalze

1 g des in Beispiel 1 beschriebenen 2-Benzthiazolyl-(2)-3-phenyl-5-(4-N-trimethylammonium-phenyl)-tetrazolium-dichlorids werden in 5 - 10 ml Wasser gelöst und unter gutem Rühren langsam mit dem festen Natriumsalz des gewünschten Anions versetzt. Die mehr oder weniger schnell ausfallenden Tetrazoliumsalze werden abgesaugt und umkristallisiert.

Auf diese Weise werden hergestellt:

Dibromid: gelbe Kristalle aus Äthanol, Fp. 174 - 176° C (Zers.)

Dijodid: rote Nadeln aus Methanol, Fp. 160 - 163° C (Zers.)

Difluoborat: gelbe Nadeln aus Methanol, Fp. 213 - 215° C (Zers.)

Diperchlorat: gelbe Kristalle aus Methanol, Fp. 207 - 210° C (Zers.)

Dinitrat: gelbe Kristalle aus Propanol-Äther, Fp. 213 - 215° C
(Zers.)

Ditosylat: hellgelbes Pulver aus Äthanol-Äther, Fp. 222 - 224° C
(Zers.)

309813/1188

2147466

B e i s p i e l 3

Bestimmung der Aktivität von Lactat-Dehydrogenase im Serum

2,5 ml eines Natriumpyrophosphatpuffers (pH 8,6), der 48 mMol L-Lactat enthält, werden mit 0,2 ml einer Lösung gemischt, die 0,6 - 1,2 mg NAD^+ pro ml einer verdünnten Pufferlösung (Kaliumphosphat, pH 7,4) und mindestens 0,2 mg Diaphorase pro ml enthält. Zu diesem Gemisch gibt man 0,2 ml einer wässrigen Lösung, welche mindestens 1 mg/ml 2-Benzthiazolyl-(2)-3-phenyl-5-(4-N-trimethylammoniumphenyl)-tetrazolium-dichlorid enthält. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,1 ml Serum in Gang gesetzt. Die Änderung der Extinktion pro Minute ($\Delta E/\text{min}$) in den ersten 5 Minuten nach Start wird bei 25°C gegen einen Blindwert gemessen (546 nm) und die Volumenaktivität nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Volumenaktivität [U/L]} = \frac{\Delta E/\text{min} \cdot V \cdot 1000}{\epsilon \cdot d \cdot v}$$

$$\epsilon = 27,4 \left(\frac{\text{cm}^2}{\text{U Mol}} \right), d = \text{Schichtdicke, } v = \text{Probenvolumen, } V =$$

Testvolumen, 1000 = Umrechnungsfaktor von mL auf L.

In analoger Weise lassen sich die Aktivitäten folgender Enzyme bestimmen:

- a.) α -Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase, mit α -Hydroxybuttersäure
- b.) Malat-Dehydrogenase, mit Malat
- c.) Sorbit-Dehydrogenase, mit D-Sorbit
- d.) Alkohol-Dehydrogenase, mit Äthanol

2147466

B e i s p i e l 4

Bestimmung von Glycerin im Serum

2,3 ml Puffer (0,2 molarer Glycin/Natriumcarbonatpuffer. pH = 8,0 - 9,0) werden mit 0,2 ml einer Lösung gemischt, die 25 mg ATP, 0,5 mg Glycerokinase und 1,0 mg α -Glycero-phosphat-Dehydrogenase enthält. Zu diesem Gemisch gibt man 0,2 ml einer Lösung, welche 0,6 - 1,2 mg NAD⁺ pro ml einer verdünnten Pufferlösung (Kaliumphosphat, pH 7,4) und mindestens 0,2 mg Diaphorase pro ml enthält. Anschließend gibt man 0,2 ml einer wäßrigen Lösung zu, welche mindestens 1 mg/ml 2-Benzthiazolyl-(2)-3-phenyl-5-(4-N-trimethylammoniumphenyl)-tetrazolium-dichlorid enthält. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,1 ml Serum in Gang gesetzt.

Sofort nach Serumzugabe wird die Anfangsextinktion E_1 bei 546 nm abgelesen; nach 25 Minuten die Endextinktion E_2 und aus der Differenz $\Delta E (= E_2 - E_1)$ der Gehalt nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \frac{\Delta E \cdot V \cdot MW}{\epsilon \cdot d \cdot v}$$

V = Testvolumen

v = Probenvolumen

MW = Molekulargewicht

$\epsilon = 27,4 \text{ [cm}^2/\text{Mol]}$

d = Schichtdicke [cm]

In analoger Weise lassen sich folgende klinisch chemisch wichtige Substrate bestimmen:

Glucose mit ATP, Hexokinase und NADP, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

α -Hydroxybuttersäure mit α -Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase

Äpfelsäure mit Malat-Dehydrogenase

Neutralfette (nach Verseifung mit äthanolischer KOH und Bestimmung des Glyceringehalts)

Äthylalkohol mit Alkohol-Dehydrogenase

D-Sorbit mit Sorbit-Dehydrogenase

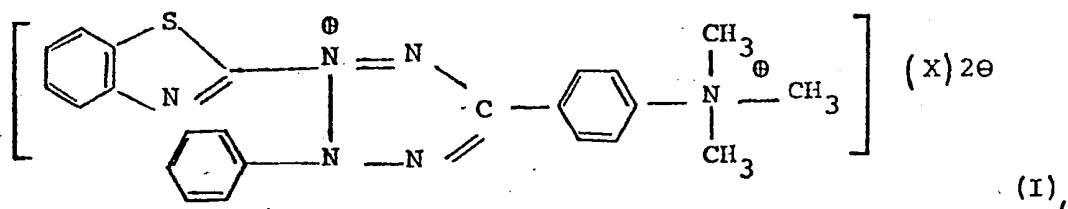
309813/1188

./.

2147466

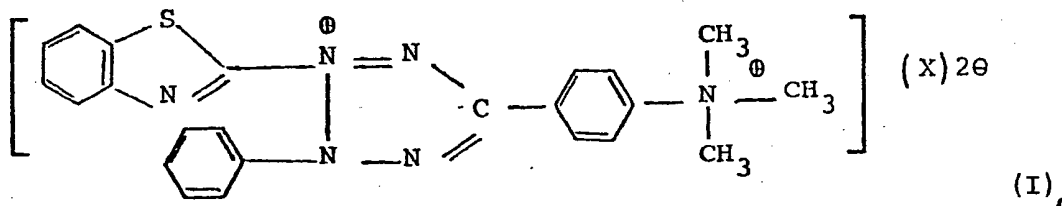
P a t e n t a n s p r ü c h e

- 1.) 2-Benzthiazolyl-(2)-3-phenyl-5-(4-N-trimethylammonium-phenyl)-
tetrazoliumsalze der Formel I



in welcher X ein oder mehrere Anionen
organischer oder anorganischer Säuren bedeutet.

- 2.) Verfahren zur Herstellung von Benzthiazolyl-(2)-3-phenyl-5-
(4-N-trimethylammonium-phenyl)-tetrazoliumsalzen der Formel I.

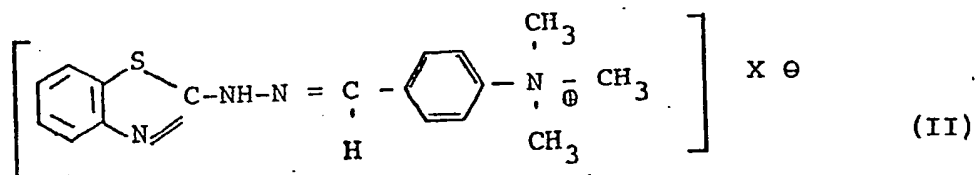


in welcher X ein oder mehrere Anionen organischer
oder anorganischer Säuren bedeutet,

309813/1188

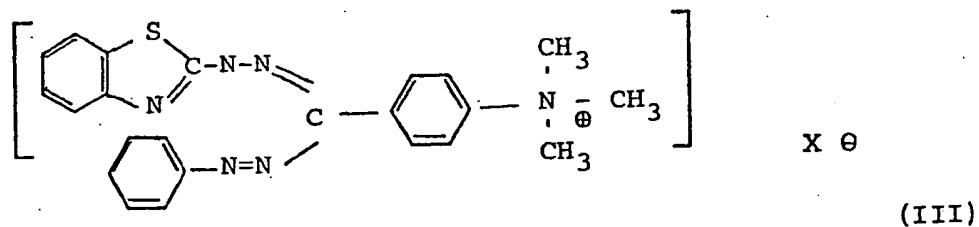
2147466

dadurch gekennzeichnet, daß man in an sich bekannter Weise ein Hydrazon der Formel II



in welcher X^Θ die obengenannte Bedeutung hat,

mit einem reaktiven Benzoldiazoniumsalz umgesetzt und das erhaltene Formazan der Formel III



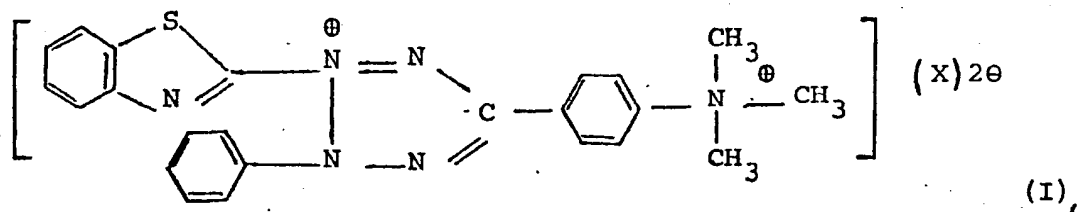
in welcher X^Θ die obengenannte Bedeutung hat,

mit einem geeigneten Oxidationsmittel umgesetzt und gewünschtenfalls das Anion X^Θ mit entsprechenden Alkalisalzen oder entsprechend beladenen Ionenaustauschern modifiziert.

309813/1188

2147466

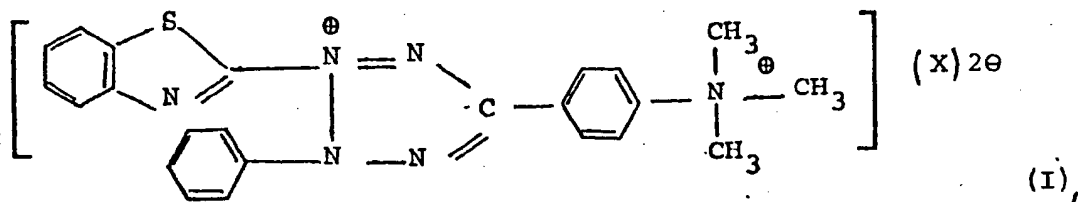
- 3.) Verwendung von 2-Benzthiazol-(2)-3-phenyl-5-(4-N-trimethylammonium-phenyl)-tetrazoliums Salzen der Formel I



in welcher X ein oder mehrere Anionen organischer oder anorganischer Säuren bedeutet,

zum Nachweis von biologischen Reduktionsvorgängen.

- 4.) Testreagens zum Nachweis von Reduktionsvorgängen, gekennzeichnet durch einen Gehalt an 2-Benzthiazolyl-(2)-3-phenyl-5-(4-N-trimethylammonium-phenyl)-tetrazoliums Salzen der Formel I



in welcher X ein oder mehrere Anionen organischer oder anorganischer Säuren bedeutet,

309813/1188